DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2016.109409

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۲، صفحه ۱۹۸-۱۹۰ (۱۳۹۵)

بررسی اثر فلز روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز با PCR در زمان واقعی

محمد طغرلی[۱]، جعفر وطن‌دوست *[۲] و ملک حسین اسدی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار

پست الکترونیک: j.vatan@hsu.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

چکیده

روی به‌عنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان، نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای متابولیکی گیاهان ازجمله بیان ژن لیمونن سینتاز برعهده دارد. لیمونن سینتاز به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار می‌باشد که در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارد. از این‌رو در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز و در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن با روش Real time PCR بررسی شد. نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در غلظت‌های مختلف نشان داد که در گیاهان تیمار شده، افزایش غلظت روی تا ۱۰۰ میکرومولار با افزایش بیان ژن لیمونن سینتاز رابطه مستقیم دارد. با توجه به‌نقش آنزیم لیمونن سینتاز، افزایش بیان آن می‌تواند از طریق افزایش تولید مونوترپن‌ها در گیاه باعث تولید بیشتر روغن‌های فرار و در نتیجه محافظت گیاه در مقابل علف‌خوارها شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، روی، زیره سبز، لیمونن سینتاز، Real time PCR

مقدمه

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که نه تنها در فهرست قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان ثبت شده است، بلکه در فهرست جدیدترین منابع ارائه شده نیز جایگاه خود را حفظ کرده است. زیره سبز گیاهی یکساله، دگرگشن و دارای عدد کروموزومی ۲n = ۱۴ است. این گیاه یکی از محصولات مهم صادراتی است که با توجه به‌شرایط خاص اکولوژیکی مورد نیاز برای کشت آن، در مناطق محدودی از جهان تولید می‌شود. زیره سبز دارای خواص دارویی فراوانی ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است (Takayuki *et al.*, 2007). عصاره زیره سبز میزان قند خون و کلسترول مضر LDL اکسید شده را کاهش و فعالیت آریل استرازی آنزیم پاراکسوناز را افزایش می‌دهد که این ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد (Willer *et al.*, 2005 ; Thippeswamy *et al.*, 2008). فلاونوئیدهای موجود در زیره سبز احتمالا با کاهش رادیکال‌های آزاد، پیشگیری از سرطان و یا مهار آن را انجام می‌دهند و باعث مهار تجمع پلاکت‌ها نیز می‌شوند (Ghorbanli *et al.*, 2012; Srivastava, 1989).

ویژگی‌های دارویی مهم زیره سبز مربوط به‌قسمت مهم و مورد استفاده این گیاه یعنی میوه آن است که دارای حدود ۵-۲ درصد روغن فرار است (Behera *et al.*, 2004Kan *et al.*, 2007). ترکیبات ثانویه زیادی ازجمله فلاونوئیدها و ترپنوئیدها عمده اجزای تشکیل‌دهنده روغن‌های فرّار این گیاه هستند (Thippeswamy *et al.*, 2005). ترپنوئیدها بزرگترین گروه از متابولیت‌های ثانویه گیاهی و متنوع‌ترین ترکیبات به‌لحاظ ساختاری و عملکردی هستند که برخی از انواع فرّار آنها در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارند (Dudareva *et al.*, 2006 Zwenger *et al.*, 2008). از رایج‌ترین و ساده‌ترین مونوترپن‌ها، لیمونن است که در ابتدای مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها، یک عامل محدود کننده در تولید این ترکیبات شیمیایی است (Gershenzon *et al.*, 2000 Mahmoud *et al.*, 2004Turner *et al.*, 1999). در واقع لیمونن از پیش‌ماده ژرانیل دی فسفات (GPP) به‌وسیله لیمونن سینتاز بوجود می‌آید. لیمونن سینتاز به‌عنوان یک آنزیم سیکلاز عامل مهمی در مسیر بیوسنتزی روغن‌های فرار به‌شمار می‌رود. بنابراین هرگونه دست‌ورزی در بیان ژن‌های آنها می‌تواند موجب تغییر ترکیب‌های موجود در روغن‌های فرار گیاهی (مانند عطر و اسانس)، تولید مونوترپن‌ها در اندام‌هایی از گیاه که آنها را تولید نمی‌کنند و یا حتی گونه‌هایی که فاقد آنها هستند، شود (Kjonaas *et al.*, 1983 Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2008). بیان ژن لیمونن سینتاز در جوانترین مراحل نموی گل‌ها زیاد بوده و به‌تدریج کاهش می‌یابد، همچنین این ژن در مراحل مختلف رشد و نموی گیاهان کامل، از گیاهچه‌های دو برگی تا مرحله گلدهی بیان می‌شود. حداکثر بیان ژن لیمونن سینتاز در ساقه بوده و بیان بالای ژن لیمونن سینتاز در اندام‌های جوان زایشی مولد ثابت شده است، در حالی‌که بیان زیاد آن در بافت رویشی ساقه و کل دوره زندگی گیاه قابل توجه است (Zarinkamar *et al.*, 2012). همچنین زیاد بودن پیش‌ماده سنتز مونوترپن‌ها (GPP) در بافت‌های جوان می‌تواند سبب تولید سریع مونوترپن‌ها در این بافت‌ها برای دفع علف‌خوارها و یا جذب شکارگرهای آنها شده و در نتیجه سبب محافظت آنها شود (Lücker *et al.*, 2004). همچنین مونوترپن‌هایی مانند لیمونن به‌مقدار زیادی در روغن‌ها و رزین‌ها وجود دارند و ذخیره‌سازی آنها اغلب با ساختارهای ترشحی پیچیده مانند کرک‌های غده‌ای، حفره‌های ترشحی یا مجاری رزینی ارتباط دارد. سنتز زیاد مونوترپن‌ها با فعالیت بالای سلول‌های این ساختارها که محل بیوسنتز و ذخیره آنها هستند ارتباط دارد و عمدتاً در بافت‌های جوان مولد، بیشترین فعالیت را دارد (Gershenzon *et al.*, 2000).

ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز وجود دارد (Ghannadnia *et al.*, 2011) و بیان آن می‌تواند تحت تأثیر عناصر ریزمغذی ازجمله روی قرار گیرد. فلز روی یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان بوده و در بسیاری از فرایندهای متابولیکی گیاه نقش دارد. این فلز به‌عنوان فعال کننده و کوفاکتور برخی آنزیم‌های حیاتی گیاه ازجمله کربونیک انیدرازها، دهیدروژنازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و RNA پلیمرازها در متابولیسم پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین به‌عنوان یک هورمون رشد ایفای نقش می‌کند (Rion *et al.*, 2004). همچنین این عنصر در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی گیاه نقش کاتالیزور فعال‌کننده یا ساختمانی دارد. عنصر روی سنتز پروتئین را افزایش داده و با انتقال اسید آمینه و کاهش جذب و تخریب RNA از تجمع اسیدهای آمینه در گیاه می‌کاهد (Brown *et al.*, 1993). در پژوهش‌های گذشته Ghannadnia و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر منگنز بر بیان ژن لیمونن سینتاز و Yousefi و همکاران (۲۰۱۱) اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور نقره بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ را در زیره سبز بررسی کردند. همینطور Zarei و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر روی بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز پرداختند. با توجه به بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز و همچنین نقش روی به‌عنوان یک عنصر ریزمغذی مهم، تأثیر تیمارهای متفاوت روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز در گیاه زیره سبز مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و کشت در گلخانه: بذر گیاه زیره سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها به‌مدت ۲۴-۳۶ ساعت در آب جاری قرار گرفتند. سپس به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ۲٪ (محلول وایتکس) به‌مدت ۳ دقیقه و محلول قارچکش گوگردی (۸۰٪ sulfur) به‌مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرها طی دو مرحله فوق و نیز در پایان ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. با توجه به رویش بهتر زیره سبز در خاک‌های با بافت سبک و ماسه‌ای، بذرهای استریل شده در گلدان‌های حاوی خاک رس و پیت ماس و ماسه (به نسبت ۱: ۱: ۱) کشت شدند و در شرایط یکنواخت گلخانه‌ای (۱۶ ساعت روشنایی با استفاده از نور مصنوعی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۳ ± ۲۳ °C) قرار داده شدند. **طرح آزمایشی** این پژوهش از نوع آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۴ تیمار اجرا شد. تجزیه واریانس داده‌ها در سطح ۱ درصد و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

آماده‌سازی الیسیتورها و تیمار نمونه‌ها: برای آماده‌سازی الیسیتورها، غلظت‌های مختلفی از سولفات روی (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µM) تهیه شد. این غلظت‌ها براساس گزارش‌های قبلی تأثیر سایر الیسیتورها انتخاب شد. برای تیمار نمونه‌ها، گیاهان در مرحله دو برگی با ریشه و به‌صورت کامل از خاک جدا شده و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف روی که از قبل تهیه شده بودند، قرار گرفتند. با توجه به اینکه هر غلظت دارای ۳ تکرار بود، بدین‌ترتیب ۱۲ نمونه جدا شده و درون ۱۲ شیشه جداگانه، که هریک حاوی غلظت‌های مختلف روی بودند، در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه به‌مدت چهار ساعت تحت تیمار با سولفات روی قرار گرفتند. پس از تیمار با سولفات روی، در شرایط استریل از اندام‌های هوایی (ساقه، برگ) گیاه نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌ها پس از تثبیت در ازت مایع به‌مدت ۵ دقیقه، در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند (Ghannadnia *et al.*, 2011).

استخراج RNA: استخراج RNA کل سلول توسط کیت استخراج RNX-Plus (شرکت سیناژن) انجام گردید، بدین صورت که مقدار ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاه داخل یک هاون چینی استریل همراه با نیتروژن مایع به‌خوبی کوبیده شد. سپس به بافت کوبیده شده ۱ میلی‌لیتر محلول RNX-Plus و بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. به‌دنبال سانتریفیوژ مخلوط حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، فاز بالایی که حاوی RNA بود به‌آرامی برداشته شد و هم حجم آن، ایزوپروپانول خنک اضافه شد. پس از سانتریفیوژ دوباره با شرایط قبل و خارج کردن مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به آن افزوده شد و نمونه به‌مدت ۸ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب تشکیل شده، ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، (diethyl pyrocarbonate) اضافه شد و در نهایت RNA استخراج شده، به فریزر با دمای ۸۰°C- منتقل شد. کمیت و کیفیت RNA با روش UV اسپکتروفتومتری (مدل Varian – CARY 50) (خواندن جذب در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر، محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (M-MuLV) با استفاده از ۲ میکروگرم RNA کل و الیگومرتیمیدین (Oligo dT18) به‌عنوان آغازگر استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا ۲ میکروگرم RNA کل با ۹µl آب تیمار شده با DEPC و ۱µl الیگو dT و ۰/۵ µl ممانعت کننده RNase و ۱ µl مخلوط dNTP 10 Mm ترکیب شد. این مواد به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C در دستگاه ترموسایکلر و پس از آن به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در مرحله بعد ۴µl بافر Reaction ۱۰X و µl ۰/۵ ممانعت کننده RNase و ۱µl آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV به ترکیب اضافه شد. در نهایت مخلوط تهیه شده در دمای ۴۲°C به‌مدت ۱ ساعت و برای غیرفعال شدن آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه

در ترموسایکلر قرار داده شد. سپس cDNA حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

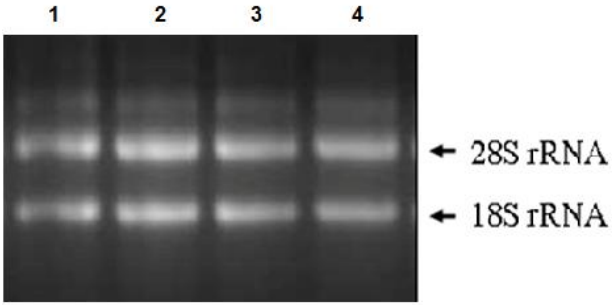
جفت پرایمرهای LS وAT به‌ترتیب برای تکثیر ژن لیمونن سینتاز به‌عنوان ژن اصلی و آلفا توبولین به‌عنوان کنترل داخلی با استفاده از توالی ژن از سایت NCBI به‌ترتیب با شماره دسترسی JN388566.1 و XM_006472309.1 و توسط نرم‌افزار Gene Runer طراحی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	میزان GC (٪)	دمای اتصال (^oC)
LSF	5'-CCCTTAACAATTTCGCCAG-3'	۴۷/۴	۵۵
LSR	5'-CCACTGTAATACCACCGAGC-3'	۵۵	۵۴/۴
ATF	5'-TTCAGTTCACATCGGTCAGG-3'	۵۰	۵۴/۷
ATR	5'-CTTTCCAGCACCAGTTTCAC-3'	۵۰	۵۴/۲

Ls: لیمونن سینتاز، AT: توبولین سینتاز

بررسی بیان ژن: برای بررسی بیان ژن لیمونن سینتاز از روش سنجش کمی Real Time PCR استفاده شد. مرحله بعد، کنترل اتصال اختصاصی پرایمرها به توالی هدف و تعیین یک دمای اتصال مناسب بود که برای پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش، با چندین بار تغییر دما در PCR، بهترین دما برای اتصال پرایمرها انتخاب شد. بهترین شرایط برای تکثیر ژن لیمونن سینتاز، دمای اتصال ۶۰^oC با تعداد ۴۰ دوره و برای ژن آلفاتوبولین دمای اتصال ۵۸^oC با تعداد ۴۰ دوره انتخاب شد. مراحل Real Time PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵^oC به‌مدت ۳ دقیقه، سپس ۹۵^oC به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰^oC برای ژن لیمونن سینتاز و ۵۸^oC برای ژن آلفاتوبولین به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲^oC به‌مدت ۴۰ ثانیه دنبال شد. در این پژوهش برای سنجش بیان ژن از دستگاهRotor Gene 3000 و برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از Real time PCR از روش پی فافل و نرم‌افزار 9.1.3 portable و SAS برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در روش پی فافل، بیان ژن مورد نظر به‌طور نسبی در مقایسه با بیان یک ژن مرجع سنجیده می‌شود. در این روش، بازدهی تکثیر و سطح آستانه نمونه نامعلوم در مقابل نمونه کنترل به‌دست می‌آید. ژن مرجع نیز باید ژنی ازجمله ژن‌های خانه‌زاد باشد که بیان آن هنگام انجام آزمایش تغییر نکند.



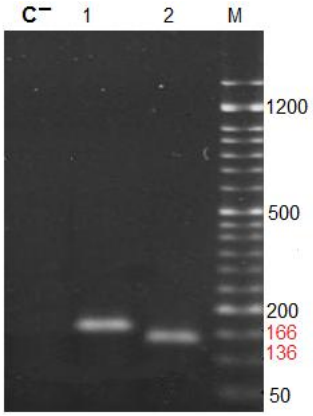
شکل ۱- کیفیت RNAهای استخراج شده از نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ (۱)، ۲۵ (۲)، ۵۰ (۳) و ۱۰۰ (۴) میکرومولار سولفات روی

نتایج

استخراج RNA: کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده به‌کمک دستگاه‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی مورد بررسی قرار گرفت. وجود دو باند 18S و 28S در rRNA نشان‌دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان‌دهنده خلوص آن می‌باشد (شکل ۱). همچنین نسبت جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260

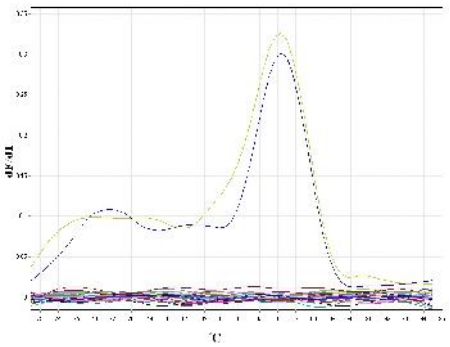
به A280 بین ۱/۹– ۱/۸ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد.

سنتز cDNA: پس از استخراج RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از پرایمرهای الیگوتیمیدین و آنزیم رونوشت بردار معکوس (M-MuLV) ساخته شد. برای یافتن دمای اتصال مناسب پرایمرهای ژن هدف (لیمونن سینتاز) و کنترل (آلفا توبولین)، واکنش گرادیان PCR انجام شد و مناسب‌ترین دما برای پرایمرهای اختصاصی انتخاب شد که بهترین دما برای پرایمرهای ژن هدف ۶۰ درجه و برای کنترل داخلی ۵۸ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. تک باند در محدوده bp ۱۳۶ برای ژن هدف و در محدوده ۱۶۶bp برای آلفا توبولین در مورد همه نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۲).

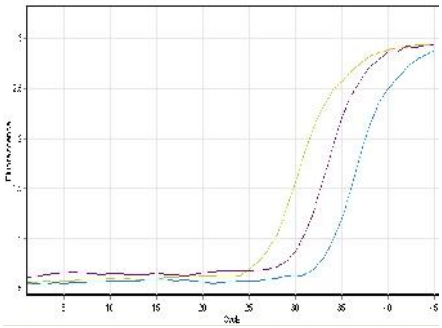


شکل ۲– تصویر حاصل از تکثیر ژن آلفا توبولین (۱) و لیمونن سینتاز (۲). C: کنترل منفی و M مارکر 50 bp (BioLab).

واکنش Real Time PCR: تکثیر ژن لیمونن سینتاز و ژن آلفاتوبولین با روش Real Time PCR براساس DNA ساخته شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. در طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر دوره را به‌صورت منحنی تکثیر نشان داد، به‌طوری‌که هر چه میزان محصول تولید شده بیشتر شود، میزان رنگ‌های متصل شده بین دو رشته DNA بیشتر و در نتیجه میزان نور فلورسنت ساطع شده نیز بیشتر خواهد شد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد و یک دوره آستانه (Ct) به‌دست آمد که نشان‌دهنده دوره‌ای می‌باشد که در آن شدت نورفلورسانت ساطع شده از تکثیر واکنش به‌حد آستانه رسیده است. از این‌رو منحنی لگاریتمی تکثیر براساس شدت نور فلورسنت ترسیم و دوره آغاز تکثیر مشخص شد. نمودار منحنی ذوب نیز نشان داد که دمای ذوب (Tm) محصول ژن لیمونن سینتاز و آلفاتوبولین به‌ترتیب حدود ۸۶ و ۸۷/۵ درجه است (شکل ۳). همچنین منحنی ذوب ژن لیمونن سینتاز و آلفا توبولین، اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان داد. وجود تنها یک قله در منحنی ذوب ژن‌ها نشان‌دهنده این مطلب است که محصول PCR این دو به‌صورت اختصاصی تکثیر شده است. برای مشخص شدن بازدهی آزمایش، بازدهی PCR به‌دست آمد. برای به‌دست آوردن بازدهی PCR برای ژن لیمونن سینتاز و آلفاتوبولین (به‌عنوان کنترل)، ۳ رقت ۱، ۱۰، ۱۰۰ از یک cDNA مرجع تهیه شد و بدین‌ترتیب با کم شدن ۱۰ برابری رقت‌های cDNA میزان تکثیر ژن‌ها توسط دستگاه سنجیده و به‌صورت درصد مشخص می‌شود. بعد از انجام واکنش، بازدهی ژن لیمونن سینتاز و کنترل به‌ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۹۹ درصد به‌دست آمد (شکل ۴).



شکل ۳– نمودار شدت نور فلورسنت برحسب دمای ذوب برای تعیین منحنی ذوب محصول ژن لیمونن سینتاز



شکل ۴- نمودار شدت نور فلورسنت برحسب دوره‌های PCR. منحنی‌ها از چپ به راست مربوط به رقت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰

تأثیر روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز: پس از انجام واکنش Real Time PCR و پردازش اطلاعات حاصل از منحنی‌های استاندارد و به‌دست آوردن Ct برای هر دو ژن لیمونن سینتاز و آلفاتوبولین برای تمام نمونه‌ها، از روش پی‌فافل و نرم‌افزار SAS 9.1.3 portable برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

با توجه به‌نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش، اثر غلظت‌های سولفات روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز

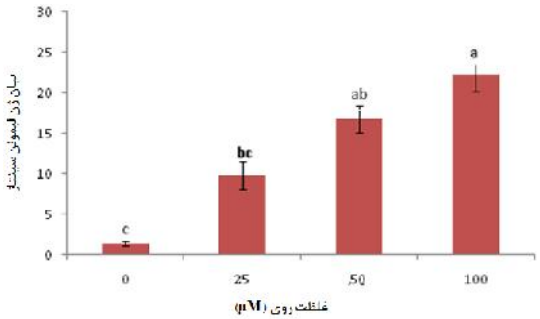
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۲۴۳/۵۰**
خطای آزمایش	۸	۲۱/۷۸

**: اختلاف بین تیمارها از نظر آماری در سطح ۱ درصد را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که الیسیتور روی در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لیمونن سینتاز نسبت به نمونه شاهد (۰) می‌شود، اما غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد (۰) اختلاف معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج این پژوهش، وجود الیسیتور روی تا ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن نسبت به نمونه شاهد می‌شود و در غلظت ۱۰۰ µm بیشترین میزان بیان ژن را نسبت به نمونه شاهد نشان می‌دهد. البته بین تیمار شاهد (۰) با تیمار (۲۵) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما تیمار شاهد از نظر آماری با تیمارهای (۵۰) و (۱۰۰) اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار	میزان بیان ژن لیمونن سینتاز (LS)
۰	۱/۳۸۸[c]
۲۵	۹/۷۸۷[bc]
۵۰	۱۶/۷۵۵[ab]
۱۰۰	۲۲/۲۲۵[a]



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز

وجود حروف مشترک بین تیمارها، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار بین آنها و نبود حروف مشترک بین تیمارها و نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آنهاست.

بحث

زیره سبز یکی از مهمترین گیاهان دارویی با ارزش می‌باشد که مطالعات کمی تاکنون در رابطه با عملکرد ژن‌های این گیاه انجام شده است. ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز به‌عنوان یک عامل مهم در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار می‌باشد و افزایش بیان آن منجر به افزایش تولید

مونوترپن‌ها در گیاه می‌شود. ازجمله عواملی که می‌تواند بر کیفیت و میزان تولید مونوترپن‌ها تأثیر بگذارد جذب عناصر غذایی میکرو می‌باشد که در مسیرهای بیوسنتزی روغن‌های فرار نقش کلیدی دارند (Dorling *et al.*, 2011). از آنجایی که روی به‌عنوان یک ریزمغذی مهم و کوفاکتور آنزیم RNA پلیمراز در سنتز پروتئین‌ها و افزایش متابولیسم پروتئین‌ها نقش اساسی دارد (Rion *et al.*, 2004)، از این‌رو در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز بررسی شد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش غلظت روی تا ۱۰۰ میکرو مولار در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن لیمونن سینتاز می‌شود، به‌طوری‌که از نظر آماری غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد (۰) داشتند. در نتیجه غلظت عنصر روی تا ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز می‌شود.

البته بیان ژن لیمونن سینتاز در حضور عناصر میکرو توسط سایر محققان نیز تأیید شده است. قنادنیا و همکاران در مطالعه خود با تأثیر چهار غلظت (ppm ۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰) از منگنز بر بیان ژن لیمونن سینتاز نشان دادند که بیشترین مقدار منگنز جذب شده و بیشترین بیان ژن لیمونن سینتاز در گیاهان تیمار شده در غلظت ppm ۸۰ بود (Ghannadnia *et al.*, 2011). همچنین نتایج حاصل از تحقیق اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور نقره (µM ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ در زیره سبز، نشان داد که این الیسیتور در دو غلظت ۵۰ و ۲۵ باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن و همچنین محتوای فلاونوئید کل نسبت به نمونه کنترل (۰) می‌شود (Yousefi *et al.*, 2011). زارعی و همکاران نیز با بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر روی بیان ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز، به این نتیجه رسیدند که وجود الیسیتور مس تا غلظت µM ۶۰ در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن لیمونن سینتاز می‌شود و افزایش بیان ژن لیمونن سینتاز در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها می‌تواند دلیلی بر فعال شدن مسیر ترپنوئیدها در پاسخ به تنش حاصل از این فلز ات باشد (Zarei, 2014).

مطالعات Ibrahim و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که احتمالا تولید مونوترپن‌ها مانند لیمونن گیاهان را در طی مراحل رشد و نمو از عوامل بیماری‌زا و علف‌خواری محافظت می‌کند. همچنین Muñoz و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که گیاه نعناع تراریخت با ژن لیمونن سینتاز می‌تواند پیش‌ماده ژرانیل دی فسفات (GPP) را به لیمونن، پینن و میرسن تبدیل کند که خاصیت دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند. بررسی‌های Lücker و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان داد که زیاد بودن پیش‌ماده سنتز مونوترپن‌ها و ژرانیل دی فسفات (GPP)، در بافت‌های جوان می تواند سبب تولید سریع مونوترپن‌ها در این بافت‌ها برای دفع علف‌خوارها و یا جذب شکارگرهای آنها شده و در نتیجه سبب محافظت آنها شود. با توجه به پژوهش‌های ذکرشده، ژن لیمونن سینتاز می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهم در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار باشد. همچنین از آنجایی که مونوترپن‌ها در روغن‌های فرار گیاهی وجود دارند، در نتیجه افزایش بیان این ژن، با افزایش تولید مونوترپن‌ها در گیاه، می‌تواند تولید روغن‌های فرار را بیشتر کرده و در نتیجه باعث دفع علف‌خوارها و محافظت گیاه در مقابل آنها شود.

منابع مورد استفاده

–Behera, S., Nagarajan, S. and Jagan Mohan Rao, L., 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. Food chemistry, 87: 25-29.

–Brown, P.H., Cakmak, I. and Zhang, Q., 1993. Form and function of zinc plants. Springer, 93-106.

–Dorling, J., Leung, S., Anderson, C., Albert, W. and McManus, M., 2011. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxlate (ACC) oxidase expression and enzyme activity in response to excess manganese in white clover (*Trifolium repens* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 49: 1013-1019.

–Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. and Orlova, I., 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences, 25: 417-440.

–Gershenzon, J., McConkey, M. and Croteau, R., 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. Plant Physiology, 122: 205-214.

–Ghannadnia, M., Haddad, R., Zarinkamar , F. and Sharifi, M. , 2011. Different expression of limonene synthase gene in organs and developmental stages of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27: 495-501.

–Ghorbanli, M. , Ahmadi, F., Monfared, A. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2012. Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L.four weeks after germination. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28: 14-21.

–Ibrahim, M., Kainulainen, P. and Aflatuni, A., 2008. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. Agricultural and Food Science, 10: 243-259.

–Kan, Y., Kartal, M., Ozek, T., Aslan, S. and Baser, K., 2007. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum* L. according to harvesting times. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 1: 25-29.

–Kjonaas, R. and Croteau, R., 1983. Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. Archives of Biochemistry and Biophysics, 220: 79-89.

–Lücker, J., Schwab, W., van Hautum, B., Blaas, J., van der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A., 2004. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. Plant Physiology, 134: 510-519.

–Mahmoud, S., Williams, M. and Croteau, R., 2004. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. Phytochemistry, 65: 547-554.

–Muñoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J., 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. Metabolic Engineering, 10: 166-177.

–Rion, B. and Alloway, J., 2004. Fundamental aspects of zinc in soils and plants, International Zinc. Association, 1-128.

–Srivastava, K., 1989. Extracts from two frequently consumed spices cumin (*Cuminum cyminum*) and turmeric (*Curcuma longa*) inhibit platelet aggregation and alter eicosanoid biosynthesis in human blood platelets. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 37: 57-64.

–Takayuki, S., Sugano, M., Majid, A. and Fujii, Y., 2007. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. Journal of Chemical Ecology, 33: 2123-2132.

–Thippeswamy, N. and Naidu, K.A., 2005. Antioxidant potency of cumin varieties cumin, black cumin and bitter cumin on antioxidant systems. Journal of European Food Research and Technology, 220: 472-476.

–Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E., Froehlich, J. and Croteau, R., 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. Plant Physiology, 120: 879-886.

–Willer, C., Sanna, S., Jackson, A., Scuteri, A., Bonnycastle, L. and Stringham, H., 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nature Genetics, 40: 161-169.

–Yousefi, K., Riahi, A. and Nasiri, M., 2011. Study of flavone synthase 1 (FNS1) gene expression in of cumin (*Cuminum cyminum*) in the presence of different concentrations of silver elicitors 12th Iranian Genetics Congress, Tehran.

–Zarei, M. 2014. Study of limonene synthase gene expression in the presence of different copper concentrations in *Cuminum cyminum* L. M.Sc. Thesis, Azad University of Sabzevar, Sabzevar .

–Zarinkamar, F., Ghannadnia, M. and Haddad, R., 2012. Limonene synthase gene expression under different concentrations of manganese in *Cuminum cyminum* L. African Journal of Plant Science, 6: 203-212.

–Zwenger, S. and Basu, C., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 3: 1-7.

Study of zinc effect on limonene synthase gene expression in cumin by Real Time PCR

M. Toghroli[1], J. Vatandoost[2*] and M.H. Asadi[3]

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. Iran.
2*. Corresponding author Assis. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. Iran, E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir
3. Assis. Prof., Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. Iran.

Received: 19.11.2015 Accepted: 21.05.2016

Abstract

Zinc as an essential element for plant growth, plays an important role in many metabolic processes of plants, such as limonene synthase gene expression pathway. Limonene synthase is considered as an important enzyme in volatile oil biosynthesis that plays significant role in plant defensive reactions. In the present study, limonene synthase gene expression in Cumin was evaluated in presence of different concentration of Zinc elicitors based on a completely randomized design. Total RNA was extracted and cDNA synthesis was performed and Real Time PCR quantity assay method was used for limonene synthase gene expression. Results of the comparison of gene expression with Duncan's multiple range tests in different concentrations showed that in treated plants, there was a direct correlation between increasing of Zinc concentration up to 100 µM and limonene synthase gene expression. Limonene synthase gene expression by increasing production of monoterpens may produce more volatile oils in plant species and thus protects the plant against herbivores.

Keywords: *Cuminum cyminum*, gene expression, limonen synthase, real time PCR, zinc.